CHROMOSOMENANALYSEN IN MENSCHLICHEN PERIPHEREN LYMPHOZYTEN NACH KURZZEITBEHANDLUNG MIT CADMIUM-, BLEI- UND ZINKACETAT SOWIE KOMBINATIONEN DIESER METALLSALZE

Karl Gasiorek

1981

Aus dem Institut für Biologie,
Abteilung für Strahlenbiologie,
der Gesellschaft für Strahlen-
und Umweltforschung mbH München

(Leiter: Prof. Dr. U. Hagen)

Chromosomenanalysen in menschlichen peripheren Lymphozyten nach Kurzzeitbehandlung mit Cadmium-, Blei- und Zinkacetat sowie Kombinationen dieser Metallsalze

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl Gasiorek
aus Sengenthal

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung
des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.rer.nat.M.Bauchinger
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.med.H.Spiess
Dekan:	Prof.Dr.med.U.Spann

Tag der
mündlichen Prüfung: 24.März 1981

Gliederung

Seite

1. Einleitung..... 1

2. Material und Methode..... 3

2.1. Materialien..... 3
2.1.1. Metall-Lösungen..... 3
2.1.2. Hank's Lösung..... 3
2.1.3. Kulturmedium..... 3
2.1.4. Blut..... 4
2.1.5. Weitere Materialien..... 4

2.2. Kultur- und Expositionsbedingungen..... 5
2.2.1. G_0-Exposition..... 5
2.2.2. Lymphozytenkultur..... 6
2.2.3. Konzentrationsmessungen..... 7
2.2.4. Begleitende pH-Messungen..... 8

2.3. Präparation und Färbung der Chromosomen..... 8

2.4. Chromosomenanalyse..... 9

2.5. Mitoseindex..... 11

2.6. Statistische Auswertung..... 11

3. Ergebnisse..... 12

3.1. Kontrollen..... 12
3.1.1. Leerkontrollen..... 12
3.1.2. Natriumacetat-Kontrollen..... 14

3.2. Schwermetalle..... 14
3.2.1. Applikation einzelner Metalle..... 14
3.2.2. Applikation von Metallkombinationen..... 17

4. Diskussion..... 23

4.1. Problematik der Konzentrationsangaben..... 23

4.2. Expositionsbedingungen..... 30

Seite

4.3. Toxische Wirkungen..... 32

4.4. Cytogenetische Effekte..... 34

4.4.1. Applikation einzelner Metalle..... 34

4.4.1.1. Cadmium..... 34

4.4.1.2. Blei..... 37

4.4.1.3. Zink..... 39

4.4.2. Applikation von Metallkombinationen..... 4o

5. Cadmium als Umweltnoxe - experimentelle und klinische Beobachtungen..... 45

6. Zusammenfassung..... 43

1. Einleitung

Schwermetalle als Umweltgifte sind nicht länger mehr nur ein Thema für Fachzeitschriften. Nach Jahren, in denen vor allem Quecksilber und Blei im Mittelpunkt des Interesses standen, beschäftigt man sich jetzt zunehmend auch mit den biologischen Wirkungen von Cadmium und Zink.
Untersuchungen zur cytogenetischen Wirkung von Blei wurden in verschiedenen Testsystemen durchgeführt. Nach in-vivo-Exposition berichten einige Autoren über positive Befunde in peripheren Lymphozyten von Menschen (13, 32, 48) und Affen mit Pb-Vergiftung (1o) sowie in Knochenmarkzellen von Mäusen (12, 31). Negative Befunde in Lymphozyten von Menschen (1, 4, 5, 36, 45, 47, 54), Mäusen (24) und Rindern (29) überwiegen.
Im Dominant-Letal-Test bei Mäusen ergab sich keine mutagene Wirkung (26).
In vitro scheint Blei weder in menschlichen Lymphozyten (11, 35, 45, 47, 48) noch in Zellkulturen des chinesischen Hamsters (3) eine chromosomenschädigende oder clastogene Wirkung zu haben. Auch Störungen am mitotischen Bewegungsapparat der Zelle konnten nicht festgestellt werden (3).
Auch bei Cadmium sind die Ergebnisse widersprüchlich. In einigen Arbeiten wird über ein vermehrtes Auftreten von Chromosomenaberrationen nach in vivo-Exposition berichtet; Testobjekte waren Wurzelspitzenzellen von Vicia faba (17) sowie menschliche Lymphozyten (2, 5o, 52). Dem stehen negative Befunde bei menschlichen Lymphozyten (7, 37) sowie Knochenmarkzellen (12, 39) und Oozyten (49) von Mäusen gegenüber.
Mutagenitätsprüfungen bei Salmonella (25), Drosophila melanogaster (23, 53) und Mäusen (41, 55) waren negativ; in Goldhamsteroozyten dagegen wurden numerische Aberrationen gesehen (6o).

Nach in vitro-Exposition wurde eine clastogene Wirkung in menschlichen Lymphozyten (51) und Zellkulturen des chinesischen Hamsters (9, 42) beobachtet. Andere Arbeitsgruppen konnten keine chromosomenschädigende Wirkung feststellen; Testobjekte waren hier menschliche Lymphozyten und Fibroblasten (11, 38), Rattenembryozellkulturen (64) sowie Mamma-Ca-Zellen der Maus (57).

Spindelwirkung konnte in Zellkulturen des chinesischen Hamsters (42) sowie in vivo bei Mäuseoozyten (49) beobachtet werden.

Nur wenige Untersuchungen liegen über Zink als potentiell chromosomenschädigendes Agens vor. Älteren positiven, an Pflanzen gewonnenen Ergebnissen (17, 43, 44) stehen neuere negative, an Vicia (22), menschlichen Lymphozyten in vivo (13) und in vitro (6) sowie Knochenmark- und Keimzellen der Maus (39) erhobene Befunde gegenüber. Ergebnisse einer Arbeitsgruppe (11) lassen eine clastogene Zn-Wirkung in menschlichen Lymphozyten in vitro möglich erscheinen.

Eine mutagene Wirkung fand sich zwar bei Salmonella in vitro (25), nicht jedoch im Dominant-Letal-Test bei Mäusen (39).

Obwohl in einigen Studien bei in vivo-Exposition Blei, Cadmium und Zink gleichzeitig beteiligt waren (2, 12, 13, 29, 32), wurde versucht, den beobachteten cytogenetischen Effekt jeweils auf einzelne dieser Schwermetalle zurückzuführen. Es wäre jedoch naheliegend, eine Kombinationswirkung anzunehmen. Dies kann in in vitro-Experimenten mit kontrollierbaren Applikationsbedingungen untersucht werden. Solche Experimente fehlen bisher jedoch. In der vorliegenden Arbeit werden daher Ergebnisse der Chromosomenanalyse in menschlichen Lymphozyten nach kombinierter Behandlung mit Blei, Cadmium und Zink vorgelegt.

2. Material und Methode

2.1. Materialien

2.1.1. Metall-Lösungen

Verwendet wurden hochreine Metallsalze (pro analysi; Merck):
$(CH_3COO)_2 Pb \times 3 H_2O$; $(CH_3COO)_2 Cd \times 2 H_2O$;
$(CH_3COO)_2 Zn \times 2 H_2O$; $CH_3COO Na$.
Anion war jeweils Acetat, weil dadurch eine bessere Löslichkeit als bei Chloriden, Sulfaten oder anderen Salzen dieser Metalle erreicht wurde.
Die Metallsalze wurden in aqua bidest gelöst, die Lösungen durch einen Bakterienfilter gepreßt und steril in Glasflaschen abgefüllt. Diese im folgenden so genannten Stammlösungen mit einer Metallkonzentration von 5×10^{-1} M (Bleiacetat), 5×10^{-2} M (Zink-, Natriumacetat) bzw. 5×10^{-3} M (Cadmiumacetat) wurden jeweils höchstens einige Tage vor den einzelnen Versuchen hergestellt, um eine Änderung der Konzentrationen durch Ausfällen (Zinkhydroxidbildung) oder Adsorption an die Glaswand (Blei) möglichst gering zu halten, und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert.

2.1.2. Hank's Lösung

0,14 g $CaCl_2$, 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,2 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,06 g $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$, 0,06 g KH_2PO_4, 0,35 g $NaHCO_3$ und 2 g Glucose wurden in der Hitze in 1,0 l aqua dest gelöst, durch einen Bakterienfilter gepreßt, steril in Glasflaschen abgefüllt und bis zum Gebrauch im Kühlschrank gelagert.

2.1.3. Kulturmedium

Verwendet wurde Ham's Medium F 10 (Gibco-Biocult). Darin ist neben Aminosäuren, Zucker, Vitaminen und anderen

Salzen auch Zinksulfat (20,8 mg/l) enthalten; diese Menge beeinflußt die in den Versuchsansätzen enthaltenen Zinkkonzentrationen in so geringem Maße, daß sie vernachlässigt werden konnte.
Fetales Kälberserum (FCS, Difco) wurde den Kulturen zugesetzt; die Kombination von F 1o und FCS ist ein vollwertiges Nährmedium, das den Lymphozyten alle zur Vermehrung nötigen Substrate liefert.
Um eventuelles Bakterienwachstum zu verhindern, wurden Penicillin und Streptomycin (beide Grünenthal) in Konzentrationen von 1oo I.E. bzw. 1 mg pro ml Medium beigefügt.

2.1.4. Blut

Sämtliche Versuche wurden mit Eigenblut durchgeführt. Das Blut wurde jeweils frisch aus einer peripheren Vene gewonnen und durch einen Zusatz von 1oo I.E. Heparin (Liquemin®, Hoffmann-LaRoche) pro ml Vollblut ungerinnbar gehalten. Zum Zeitpunkt der Blutentnahmen lag keine Erkrankung vor, eine überdurchschnittliche Exposition gegenüber Strahlen und Schwermetallen bestand nicht.

2.1.5. Weitere Materialien

Phytohämagglutinin (PHA-M, Difco) wurde zur mitogenen Stimulation peripherer Lymphozyten zugesetzt, Colcemid® (Ciba) diente als Spindelgift.
Die für Präparation und Färbung benötigten Materialien werden in 2.3. angesprochen.

2.2. Kultur- und Expositionsbedingungen

2.2.1. G_o-Exposition

Da sich die kleinen Lymphozyten im peripheren Blut in der G_o-Phase befinden, wurde für die in vitro-Experimente eine Exposition von unstimuliertem Vollblut durchgeführt. Dies erfolgte in sieben Versuchsansätzen.
In den ersten drei Versuchen wurden die Metalle Cadmium, Zink und Blei einzeln, in den Versuchen 4 bis 6 Kombinationen von zwei, im Versuch 7 Kombinationen aller drei Metalle, jeweils in verschiedenen Konzentrationen, getestet. Dazu wurden aus den auf 37° C vorgewärmten Stammlösungen mit aqua bidest Verdünnungsreihen hergestellt.

In Reagenzgläser wurden unter sterilen Bedingungen pipettiert: jeweils 1,0 ml heparinisiertes Vollblut, 3,7 - 3,9 ml F 10 (auf 37° C vorgewärmt), 0,1 - 0,3 ml Metall-Lösung. Das Gesamtvolumen betrug immer 5,0 ml.

Endkonzentrationen der Metalle im Gesamtansatz:

Vers.1: Cd 10^{-4} - 10^{-8} M (5 verschiedene Konzentrationen)

Vers.2: Zn 10^{-3} - 10^{-7} M (5 verschiedene Konzentrationen)

Vers.3: Pb 10^{-2} - 10^{-7} M (5 verschiedene Konzentrationen)

Vers.4: Cd 10^{-4} - 10^{-6} M
Zn 10^{-4} - 10^{-7} M (5 verschiedene Kombinationen)

Vers.5: Cd 10^{-4} - 10^{-6} M
Pb 10^{-3} - 10^{-6} M (5 verschiedene Kombinationen)

Vers.6: Pb 10^{-4} - 10^{-6} M
Zn 10^{-3} - 10^{-7} M (6 verschiedene Kombinationen)

Vers.7: Pb 10^{-3} - 10^{-6} M
Zn 10^{-3} - 10^{-7} M
Cd 10^{-4} - 10^{-7} M (9 verschiedene Kombinationen)

Bei jedem Versuch wurden Natriumacetat- ($2,5 \times 10^{-3}$ - 10^{-4} M) und Leerkontrollen unter identischen Bedingungen angesetzt; letztere enthielten anstelle der Metalllösungen 0,1 - 0,25 ml aqua bidest.
Nach dem Suspendieren durch vorsichtiges Schütteln wurden die Reagenzgläser für drei Stunden bei 37^{0} C inkubiert.
Um die Metalle weitgehend zu entfernen, folgte dann ein zweimaliger Waschvorgang unter sterilen Bedingungen: Zentrifugation 5 Min. bei 600 Upm, Absaugen des Überstandes, Suspension in ca. 7 ml Hank's Lösung, beim zweiten Mal in ca. 7 ml F 10-Medium. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen wurden die im Bodensatz enthaltenen Zellen in 2 ml F 10 suspendiert.

2.2.2. Lymphozytenkultur

Die peripheren Lymphozyten wurden in standardisierten Mikrokulturen gehalten. Die Kulturen (Versuch 1 - 7) hatten folgende Zusammensetzung:
3 ml F 10 (mit Penicillin und Streptomycin); 0,5 ml FCS; 0,13 ml PHA; 1 ml der in 2.2.1. beschriebenen, die Lymphozyten enthaltenden Zellsuspension. Das Gesamtvolumen betrug 4,63 ml.
In einem achten Versuch wurden normale Mikrokulturen nach dem üblichen standardisierten Verfahren angesetzt. Sie enthielten 3,5 statt 3,0 ml F 10 sowie 0,5 ml heparinisiertes Vollblut. Die übrigen Bedingungen der Lymphozytenkultur waren identisch. Diese Kulturen waren als "Kontrollen der Kontrollen" gedacht. Mit ihnen sind Anhaltspunkte über einen möglichen Einfluß der in den Versuchsansätzen 1 bis 7 notwendigen mechanischen Manipulationen - mehrfaches Zentrifugieren, Waschen und Absaugen - zu gewinnen.
Als Kulturgefäße dienten 10 ml-Erlenmeyerkölbchen, die

unter sterilen Kautelen befüllt und mit Silikonstopfen verschlossen wurden. Die Kulturen wurden bei 37° C für 48 Stunden inkubiert. Sämtliche Kulturen wurden aus Gründen der Sicherheit doppelt angelegt.
Drei Stunden vor Ende der Kulturzeit erfolgte der Zusatz von Colcemid (0,15 µg/ml) zur Anreicherung von Metaphasefiguren.

2.2.3. Konzentrationsmessungen

Bereits in Vorversuchen sowie in den Versuchen 2, 3, 5, 6 und 7 konnten in allen Ansätzen, bei denen die Zn-Konzentration 10^{-3} M und höher und/oder die Pb-Konzentration 5×10^{-4} M und höher war, Salzausfällungen beobachtet werden. Aus diesem Grunde, und weil im Glas der üblicherweise verwendeten Reagenzgefäße Bleiverunreinigungen enthalten sind, wurden für Blei atomabsorptionsspektrometrische Messungen durchgeführt.
Dazu wurden bei Versuch 3 vier Ansätze jeweils doppelt ausgeführt, zum einen in Reagenzgläsern aus Glas, zum anderen in solchen aus bleifreiem Quarz. Die übrigen Bedingungen waren identisch. Nach der Inkubationszeit von 3 h wurden die Suspensionen wie üblich zentrifugiert, und die im Überstand enthaltenen Bleikonzentrationen gemessen [1].
Die Ergebnisse der Messungen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Lediglich bei der höchsten Bleikonzentration von 10^{-2} M lagen die gemessenen Werte deutlich unter der eingegebenen Konzentration. In den niedrigeren Bereichen stimmten errechnete und gemessene Pb-Konzentrationen in etwa überein, wobei zwischen 10^{-3} und 10^{-6} M die Meßfehlerbreite ca. $\pm$ 10 % beträgt, darüber und dar-

---

[1] Die Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Schramel, GSF Neuherberg, durchgeführt.

unter jedoch höher liegt [1]. Ein Einfluß des Inkubationsgefäßmaterials auf die tatsächlichen Metallkonzentrationen kann nach den vorliegenden Ergebnissen ausgeschlossen werden.

2.2.4. Begleitende pH-Messungen

Lymphozyten vermehren sich am besten im neutralen bis schwach sauren Milieu. Da sich durch die Zugabe von Heparin und Schwermetallsalzen die Anzahl der sauren Valenzen vermehrte, wurden bei einigen Versuchen begleitende pH-Messungen durchgeführt. Dabei ergab sich, daß alle G_o-Ansätze schwach sauer reagierten; die Wirkung der darin enthaltenen Puffersysteme (Proteine, Sulfat-, Phosphat-, Carbonat- und andere Puffer) war somit ausreichend, und die Kulturen brauchten nicht mit CO_2 begast zu werden.

2.3. Präparation und Färbung der Chromosomen

Nach Ende der 48-stündigen Kulturzeit wurde die Kulturflüssigkeit aus den Erlenmeyerkölbchen in Zentrifugengläser umgefüllt und 5 Minuten bei 900 Upm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment in 5 ml Hank's Lösung suspendiert, die Suspension wie vorher zentrifugiert, und der Überstand erneut abgesaugt. In einer hypotonen Lösung (0,4 ml Hank's Lösung + 1,6 ml aqua bidest) wurden die Zellen 9 Minuten bei 37° C inkubiert. Dabei quellen die Lymphozyten auf, die Erythrozyten dagegen platzen. Nach erneuter Zentrifugation (5 Min., 900 Upm) wurden die zerstörten Erythrozyten abgesaugt. Die im Sediment verbliebenen Lymphozyten wurden nun in einem Gemisch aus Eisessig und Metha-

---

[1] Angaben von Herrn Dr. Schramel

nol im Verhältnis 1 : 3 für 3o Minuten fixiert; nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in ca. o,5 ml der Fixativmischung suspendiert. Pro Präparat wurden 3 Tropfen dieser Suspension auf ultraschallgereinigte, in aqua dest auf 4° C gekühlte Objektträger aufgebracht. Die Präparate wurden kurz durch eine Bunsenflamme gezogen - dadurch breiten sich die Metaphasechromosomen flach auf dem Objektträger aus -, luftgetrocknet und zur Identifikation beschriftet.
Die Färbung erfolgte nach einer kombinierten Feulgen-Orceineisessig-Methode.
Nach 9-minütiger Hydrolyse in 1 N HCl bei 6o° C wurden die Präparate zunächst zwei Stunden in fuchsinschwefliger Säure im Dunklen gefärbt und nach dem Abspülen der Färbelösung bei Zimmertemperatur luftgetrocknet. Dann wurden sie 1o bis 12 Minuten in Orceineisessig gefärbt, in einer ansteigenden Alkoholreihe - Äthanol 96 %, zweimal Isopropanol 99 %, Isopropanol/Xylol 1 : 1, zweimal Xylol - entwässert, mit Caedax® (Merck) eingedeckt und einige Stunden bei 4o° C getrocknet.

2.4. Chromosomenanalyse

Zunächst wurden im Phasenkontrastmikroskop bei 2oo-facher Vergrößerung Mitosefiguren gesucht, die für die endgültige Chromosomenanalyse geeignet schienen. Kriterien für diese Vorauswahl waren:

- Die Zellen befinden sich im Metaphasestadium. C-Anaphasefiguren werden nicht protokolliert.
- Die Metaphaseplatten sind nicht zerrissen; es ist zu erwarten, daß bei der Auswertung mit stärkerer Vergrößerung ein vollständiger Chromosomensatz eindeutig einer Metaphase zuzuordnen ist.
- Alle Chromosomen einer Metaphasefigur sind gleichmässig gut gefärbt.

- Die Metaphasen sind gut gespreitet; d.h. die Zentromere sind eindeutig zu identifizieren, die Chromosomen liegen im Idealfall getrennt voneinander, oder übereinanderliegende Chromosomen lassen sich einzeln bewerten.

Die endgültige Chromosomenanalyse erfolgte bei 156o-facher Vergrößerung im Phasenkontrast mit Ölimmersion. Zuerst wurden die in der Metaphaseplatte vorhandenen Einzelfiguren gezählt, und nur Mitosen mit 46 Zentromeren weiter analysiert. Anschließend wurde die Struktur der Chromosomen begutachtet, und auftretende Defekte protokolliert.

Pro Metallkonzentration wurden auf diese Weise jeweils 2oo Metaphasen untersucht, ebenso von jeder Kontrolle; von den Kontrollen des Versuchs 8 wurden 4oo Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden 11ooo Zellen analysiert und nach einem Schema von Bauchinger und Hug (1966) klassifiziert:

N - Zellen: Zellen mit normalem Chromosomenmuster;

S - Zellen: Zellen mit Strukturdefekten der Chromosomen
  a) Bruchstückverluste
     - Chromatidbrüche (chri)
     - acentrische Fragmente (ace)
     - minutes (min)
  b) Strukturumbauten
     - dicentrische Chromosomen (dic)
     - atypische Chromosomen (atyp)
     - chromatidale Austauschprozesse (exch);

U - Zellen: Zellen mit unspezifischen Defekten ohne Unterbrechung der Kontinuität der Chromosomenstruktur
  - achromatische Lücken (gaps, isogaps).

Der gesamte Chromosomenschaden wurde in Form einer Bruchrate dargestellt; dazu wurde jeweils die zur Entstehung

der einzelnen Aberrationstypen notwendige Zahl von Primärbrüchen bestimmt (1 Bruchereignis für Chromatidbrüche und acentrische Fragmente, 2 Bruchereignisse für alle übrigen strukturellen Aberrationen).

2.5. Mitoseindex

Unter Mitoseindex versteht man das Verhältnis der Mitosen zur Anzahl der sogenannten Blasten (transformierte T-Lymphozyten in Interphase). Durch Zählung von je 1000 Zellen in zwei verschiedenen Präparaten wurden diese Indices ermittelt. Daraus wurde der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung errechnet.

2.6. Statistische Auswertung

Zum Vergleich der cytogenetischen Befunde nach Metallapplikation mit jenen in Kontrollen wurde der U-Test nach Mann und Whitney benützt. Es handelt sich um einen parameterfreien Rangordnungstest, der zwei voneinander unabhängige Stichproben als Voraussetzung fordert. Die Größe U wurde jeweils errechnet und mit den kritischen U-Werten aus entsprechenden Tabellen (Weber, 1967) verglichen. Zugrunde lag eine Irrtumswahrscheinlichkeit $P = 0{,}05$.

3. Ergebnisse

3.1. Kontrollen

3.1.1. Leerkontrollen

Bei den Versuchen 1 - 7 wurden jeweils Kontrollkulturen unter identischen Bedingungen angesetzt, die anstelle einer Metall-acetat-Lösung aqua bidest enthielten. In einem achten Versuch wurden normale Mikrokulturen angesetzt, die nicht den sonst üblichen mechanischen Manipulationen unterzogen wurden (Tab. 1).
Mit Hilfe eines t-Tests konnte nachgewiesen werden, daß sich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit P = 0,01 diese Leerkontrollen nicht signifikant voneinander unterschieden. Für die statistische Analyse wurden sämtliche strukturellen Aberrationen (Chromatidbrüche, acentrische Fragmente und minutes) sowie unspezifischen Defekte (gaps) berücksichtigt.
Es ist somit gesichert, daß bei einer sorgfältigen Versuchsdurchführung die notwendigen zusätzlichen Manipulationen bei einer G_0-Exposition - Waschen, Zentrifugieren, Absaugen - keine Erhöhung der chromosomalen Defekte hervorrufen. Zeitliche Einflüsse - die Versuche fanden ja an verschiedenen Tagen statt - können ebenfalls ausgeschlossen werden.
Aufgrund der Homogenität der Leerkontrollen wurden die Befunde zusammengefaßt, sodaß für den statistischen Vergleich der cytogenetischen Ergebnisse der einzelnen Versuche jeweils neun Kontrollversuche mit insgesamt 2000 Zellen zur Verfügung standen.
Als Chromosomenveränderungen wurden am häufigsten unspezifische Defekte beobachtet. Hierzu werden achromatische Lücken, teils an einem (gaps), teils an beiden Armen eines Chromosoms an identischer Position (isochromatid-gaps), gezählt, die jedoch keine echten Diskontinuitä-

Tabelle 1: Chromosomenanalyse in unbehandelten Mikrokulturen

(Versuch 8; Erläuterung der Zell- und Aberrationstypen in 2.4. und 2.5.)

Zellzahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle	S-Zellen %	chri /Zelle	Bruchrate	M.I. ± s.d. ‰
400	94,5	5,25	0,055	0,25	0,0025	0,0025	69 ± 4,24

ten der Chromosomenstruktur darstellen. Das Verhältnis gaps zu isogaps betrug etwa 2o : 1.
Strukturelle Defekte waren weit seltener zu beobachten. Am häufigsten waren chromatidale Bruchstückverluste (Chromatid- und Isochromatidbrüche). An chromosomalen Aberrationstypen waren lediglich ein acentrisches Fragment und eine interstitielle Deletion (minute) zu sehen.

3.1.2. Natriumacetat-Kontrollen

Abgesehen von einer Chromatidaustauschfigur waren die beobachteten Chromosomenveränderungen identisch mit denen der Leerkontrollen. Quantitative Unterschiede liessen sich nicht nachweisen (U-Test; P = o,o5). Dem Anion Acetat kann somit eine cytogenetische Wirkung zumindest in den verwendeten Konzentrationen nicht zugeschrieben werden.

3.2. Schwermetalle

3.2.1. Applikation einzelner Metalle

Ein Sistieren der mitotischen Aktivität der Lymphozyten konnte lediglich bei der höchsten Pb-Konzentration von $1o^{-2}$ M (Versuch 3, Tabelle 4) festgestellt werden. Die wenigen Mitosen waren verklumpt und nicht auswertbar. Bei den hohen auswertbaren Pb- und Zn-Konzentrationen ($1o^{-3}$, $1o^{-4}$ M), nicht jedoch bei Cd $1o^{-4}$ M, konnten Einflüsse auf die Qualität der Präparate festgestellt werden. In vielen Metaphasen waren die Chromosomen stark kontrahiert oder zeigten eine aufgefaserte Struktur. Die Färbung war teils hyper-, teils hypochromatisch, so daß sowohl die Vorauswahl der zur Chromosomenanalyse geeigneten Metaphasen als auch ihre endgültige Beurteilung stark erschwert waren.

Tabelle 2: Chromosomenanalyse nach Cadmiumacetat-Behandlung

(Versuch 1; Erläuterung der Zell- und Aberrationstypen in 2.4. und 2.5.; Na = Natriumacetat, Ko = Kontrolle)

	Konz. (M)	Zell-zahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle	S-Zellen %	Aberrationen /Zelle		Bruch-rate	M.I. ± s.d. ‰
							chri	ace		
Cd	10^{-4}	200	83,0	14,5	0,160	2,5	0,020	0,005	0,025	72,0 ± 2,83
	10^{-5}	200	89,0	10,0	0,115	1,0	0,010	-	0,010	47,5 ± 4,95
	10^{-6}	200	87,5	12,0	0,135	0,5	0,005	-	0,005	64,5 ± 4,95
	10^{-7}	200	90,5	7,5	0,085	2,0	0,010	0,010	0,020	65,0 ± 2,83
	10^{-8}	200	93,5	5,5	0,055	1,0	0,010	-	0,010	64,5 ± 9,19
Na	10^{-4}	200	92,5	7,0	0,070	0,5	0,005	-	0,005	61,0 ± 9,90
Ko	-	200	93,5	6,5	0,070	-	-	-	-	45,0 ± 4,24

Tabelle 3: Chromosomenanalyse nach Zinkacetat-Behandlung

(Versuch 2; Erläuterung der Zell- und Aberrationstypen in 2.4. und 2.5.; Na = Natriumacetat, Ko = Kontrolle)

	Konz. (M)	Zell-zahl	E-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle	S-Zellen %	Aberrationen /Zelle		Bruch-rate	M.I. $\pm$ s.d. ‰
							chri	acc		
Zn	10^{-3}	200	97,0	2,5	0,025	0,5	0,005	-	0,005	37,50 $\pm$ 2,12
	10^{-4}	200	93,0	7,0	0,075	-	-	-	-	44,00 $\pm$ 7,07
	10^{-5}	200	96,5	3,0	0,030	0,5	0,005	-	0,005	55,00 $\pm$ 2,83
	10^{-6}	200	90,0	9,5	0,090	1,5	0,010	0,005	0,015	48,00 $\pm$ 4,24
	10^{-7}	200	94,0	6,0	0,060	-	-	-	-	49,75 $\pm$ 0,35
Na	10^{-3}	200	92,5	7,5	0,075	-	-	-	-	37,50 $\pm$ 7,78
Ko	-	200	92,0	7,5	0,080	0,5	0,005	-	0,005	50,50 $\pm$ 3,54

Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse (Versuche 1 - 3) sind in den Tabellen 2, 3, 4 und 9 zusammengestellt. Im Vergleich zu den Leerkontrollen konnte weder bei Zink noch bei Blei eine signifikant erhöhte Rate struktureller Aberrationen oder unspezifischer Defekte festgestellt werden. Für Blei in der höchsten verträglichen Dosis von 10^{-3} M scheint jedoch eine Tendenz für einen Anstieg achromatischer Lücken zu bestehen. Nach den hier vorliegenden Zahlen könnte dies möglicherweise durch Überschreitung einer zwischen 10^{-4} und 10^{-3} M liegenden Schwellenkonzentration erfolgen. Statistisch signifikant konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden (r = 0,95; df = 2).
Cadmiumapplikation erhöhte dagegen sowohl die Rate struktureller als auch unspezifischer Chromosomendefekte. In die statistische Analyse gingen ein: achromatische Lücken, Chromatidbrüche, der am häufigsten vorkommende Aberrationstyp, sowie die Bruchrate. Im Vergleich zu den Leerkontrollen waren bei alleiniger Cd-Exposition alle drei Raten signifikant erhöht ($P < 0,05$). Für gaps ergab sich eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung (r = 0,92, df = 3; $0,05 > P > 0,01$), bei den strukturellen Aberrationen dagegen konnte eine Korrelation mit der Dosis nicht nachgewiesen werden. Ferner konnte ein vermehrtes Auftreten von gaps, nicht jedoch eine Erhöhung struktureller Aberrationen im Vergleich zu den Kombinationen mit Cadmium (Cd + Zn, Cd + Pb, Pb + Zn + Cd) signifikant nachgewiesen werden ($P < 0,05$).

3.2.2. Applikation von Metallkombinationen

Die kombinierte Applikation der drei Schwermetalle in den Konzentrationen Pb 10^{-3} M, Zn 10^{-3} M und Cd 10^{-4} M (Versuch 7, Tabelle 8) führte zu einer deutlichen

Tabelle 4: Chromosomenanalyse nach Bleiacetat-Behandlung

(Versuch 3; Erläuterung der Zell- und Aberra-
Na = Natriumacetat; Ko = Kontrolle)

	Konz.[a] (m)		Konz.[b] (m)	Zell-zahl	M-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle
Pb	10^{-2}	qu	$1{,}54\times10^{-3}$	- - - - - - - - - - - - - - - - - -			
	10^{-2}	gl	$2{,}41\times10^{-3}$	- - - - - - - - - - - - - - - - - - toxische			
	10^{-3}	qu	$1{,}21\times10^{-3}$	200	90,0	9,5	0,105
	10^{-4}	qu	$2{,}17\times10^{-4}$	200	93,0	6,5	0,065
	10^{-4}	gl	$2{,}17\times10^{-4}$	200	94,5	5,5	0,055
	5×10^{-6}	qu	$5{,}79\times10^{-6}$	200	97,0	2,5	0,025
	5×10^{-6}	gl	$6{,}27\times10^{-6}$	200	96,0	3,5	0,035
	10^{-7}	qu	$< 5\times10^{-8}$ [c]	200	93,5	4,5	0,040
	10^{-7}	gl	$< 5\times10^{-8}$ [c]	200	95,0	5,0	0,050
Na	10^{-3}		-	200	94,5	5,0	0,050
Ko	-		-	200	93,5	6,5	0,075

a) eingegebene Konzentration
b) mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessene Konzen-
c) unterhalb der Nachweisgrenze

qu = Quarz-Erlenmeyerkölbchen; gl = Glas-Erlenmeyerkölbchen

tionstypen in 2.4. und 2.5.;

S-Zellen %	Aberrationen / Zelle			Bruch-rate	M.I. % ± s.d.
	chri	ace	exch		
Wirkung					
0,5	0,005	-	-	0,005	76,50 ± 2,12
0,5	0,005	-	-	0,005	61,67 ± 11,55
-	-	-	-	-	56,50 ± 0,71
0,5	0,005	-	-	0,005	72,00 ± 11,27
0,5	-	0,005	-	0,005	65,00 ± 9,54
2,0	0,010	0,010	-	0,020	74,00 ± 4,24
-	-	-	-	-	49,67 ± 8,00
0,5	-	-	0,005	0,010	74,50 ± 2,12
-	-	-	-	-	31,33 ± 8,74

tration (s. 2.2.3. und 4.1.)

Tabelle 5: Chromosomenanalyse nach kombinierter Cadmium-/Zinkacetat-Behandlung

(Versuch 4; Erläuterung der Zell- und Aberrationstypen in 2.4. und 2.5.; Na = Natriumacetat, Ko = Kontrolle)

Konz. (M)	Zell-zahl	M-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle	S-Zellen %	Aberrationen /Zelle		Bruch-rate	M.I. ‰ ± s.d.
						chri	ace		
Cd 10^{-4} Zn 10^{-4}	2oo	97,o	2,5	o,o25	o,5	o,oo5	-	o,oo5	74,oo ± 7,o7
Cd 10^{-4} Zn 10^{-7}	2oo	99,o	1,o	o,o1o	-	-	-	-	111,oo ± o,oo
Cd 10^{-5} Zn 10^{-5}	2oo	97,o	1,5	o,o2o	1,5	o,o1o	o,oo5	o,o15	77,oo ± 4,24
Cd 10^{-5} Zn 10^{-7}	2oo	93,5	6,5	o,o7o	-	-	-	-	75,5o ± 4,95
Cd 10^{-6} Zn 10^{-6}	2oo	9o,5	8,o	o,1oo	1,5	o,o15	-	o,o15	6o,5? ± 17,5o
Na 10^{-3}	2oo	9?,5	1,5	o,o15	-	-	-	-	7?,?? ± 1?,o4
Ko -	2oo	95,o	5,o	o,o55	-	-	-	-	81,oo ± 1o,54

Tabelle 6: Chromosomenanalyse nach kombinierter Cadmium-/Bleiacetat-Behandlung

(Versuch 5; Erläuterung der Zell- und Aberrationstypen in 2.4. und 2.5.; Na = Natriumacetat, Ko = Kontrolle)

Konz. (M)	Zell-zahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle	S-Zellen %	Aberrationen/Zelle			Bruch-rate	M.I. ‰ ± s.d.
						chri	ace	atyp		
Cd 10^{-4} Pb 10^{-3}	200	96,0	3,0	0,030	1,0	0,005	-	0,005	0,015	83,67 ± 3,50
Cd 10^{-4} Pb 10^{-4}	200	92,5	6,5	0,070	1,0	0,010	-	-	0,010	56,33 ± 16,20
Cd 10^{-4} Pb 10^{-6}	200	96,5	3,5	0,040	-	-	-	-	-	76,50 ± 7,78
Cd 10^{-6} Pb 10^{-3}	200	96,0	3,0	0,030	1,0	0,005	0,005	-	0,010	78,00 ± 1,41
Cd 10^{-6} Pb 10^{-6}	200	93,5	4,0	0,040	2,5	0,020	0,005	-	0,025	72,00 ± 9,17
Na 10^{-3}	200	93,0	6,0	0,070	1,0	0,005	0,005	-	0,010	95,50 ± 2,12
Ko -	200	97,0	1,5	0,020	1,5	0,010	0,005	-	0,015	83,00 ± 1,41

Tabelle 7: Chromosomenanalyse nach kombinierter Blei-/Zinkacetat-Behandlung

(Versuch 6; Erläuterung der Zell- und Aberrationstypen in 2.4. und 2.5.; Na = Natriumacetat, Ko = Kontrolle)

Konz. (M)	Zell-zahl	M-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle	S-Zellen %	Aberrationen / Zelle				Bruch-rate	M.I. ± %
						chri	ace	min	exch		
Pb 10^{-4} Zn 10^{-3}	200	85,5	11,0	0,110	3,5	0,070	-	-	0,005	0,040	64,00 ± 2,83
Pb 10^{-4} Zn 10^{-5}	200	97,5	2,0	0,020	0,5	-	-	-	0,005	0,010	76,00 ± 7,07
Pb 10^{-4} Zn 10^{-7}	200	94,5	4,5	0,045	1,0	0,005	0,005	-	-	0,010	65,00 ± 5,66
Pb 10^{-5} Zn 10^{-6}	200	97,5	2,5	0,025	-	-	-	-	-	-	70,33 ± 14,01
Pb 10^{-6} Zn 10^{-5}	200	93,0	5,5	0,060	1,5	0,015	-	-	-	0,015	66,33 ± 0,02
Pb 10^{-6} Zn 10^{-7}	200	94,5	5,0	0,055	0,5	0,005	-	-	-	0,005	75,00 ± 1,41
Na $2x10^{-2}$	200	97,0	2,5	0,035	0,5	0,005	-	-	-	0,005	56,33 ± 10,79
Ko -	200	93,0	7,0	0,070	1,0	0,005	-	0,005	-	0,015	68,50 ± 2,12

Hemmung der Mitoseaktivität. Bei einem Mitoseindex von etwa 2 ‰ war eine Auswertung nicht mehr möglich, da die wenigen Metaphasen zudem schlecht gespreitet, und die Chromosomen stark kontrahiert und nur unzureichend gefärbt waren. Ähnlich wie bei der Applikation von Pb 10^{-2} M waren hier Blasten zum größten Teil pyknotisch, deformiert und hyperchromatisch.
Abgesehen von dieser Beobachtung können eindeutige Einflüsse einzelner Metalle oder Metallkombinationen auf den stathmokinetischen Mitoseindex nicht abgeleitet werden. Die bei den einzelnen Versuchen bestimmten Mitoseindices (Tab. 1 - 8) lagen in einem Bereich von 37,5 bis 111 ‰ und zeigten zum Teil beträchtliche Schwankungen, die allerdings auch in den Leer- und Natriumacetat-Kontrollen auftraten.
Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse (Versuche 4 - 7) sind den Tabellen 5 - 9 zu entnehmen.
Weder bei der kombinierten Applikation von zwei noch von allen drei Metallen in verschiedenen Konzentrationen ergab sich im Vergleich mit den Leerkontrollen eine statistisch signifikante Erhöhung der Zahl achromatischer Lücken oder struktureller Chromosomendefekte. Hierbei war jedoch das Auftreten von zwei inkompletten Chromatidtranslokationsfiguren bei Pb/Zn-, einem atypischen Chromosom bei Cd/Pb-Behandlung sowie einem dicentrischen Chromosom bei Kombination aller drei Metalle bemerkenswert.

Tabelle 8: Chromosomenanalyse nach kombinierter Behandlung mit Blei-, Zink- und Cadmiumacetat

(Versuch 7; Erläuterung der Zell- und Aberrationstypen in 2.4. und 2.5.; Na_1, Na_2 = Natriumacetat, Ko_1, Ko_2 = Kontrollen)

Konz. (M)	Zellzahl	U-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle	S-Zellen %	Aberrationen / Zelle				Bruchrate	M.I. ± s.d. ‰
						chri	ace	min	dic		
Pb 10^{-3} Zn 10^{-3} Cd 10^{-4}	toxische Wirkung										ca. 2
Pb 10^{-4} Zn 10^{-4} Cd 10^{-4}	2oo	91,5	6,o	o,o65	2,5	o,o15	o,oo5	o,oo5	-	o,o3o	45,5o± 2,12
Pb 10^{-6} Zn 10^{-3} Cd 10^{-4}	2oo	97,o	2,o	o,o2o	1,o	o,o1o	-	-	-	o,o1o	5o,5o± 3,54
Pb 10^{-3} Zn 10^{-7} Cd 10^{-4}	2oo	93,5	5,o	o,o55	1,5	o,o1o	o,oo5	-	-	o,o15	6o,oo± 5,66
Pb 10^{-6} Zn 10^{-7} Cd 10^{-7}	2oo	93,5	6,5	o,o65	-	-	-	-	-	-	76,5o± o,71

Pb 10^{-6} Zn 10^{-3} Cd 10^{-7}	2oo	97,o	2,5	o,o25	o,5	o,oo5	-	-	-	o,oo5	77,oo± 7,o7
Pb 10^{-3} Zn 10^{-7} Cd 10^{-7}	2oo	97,5	1,5	o,o15	1,o	-	o,oo5	o,oo5	-	o,o15	6o,67±1o,26
Pb 10^{-5} Zn 10^{-5} Cd 10^{-5}	2oo	93,5	4,5	o,o5o	2,o	o,o1o	o,o1o	-	o,oo5	o,o3o	5o,oo± 4,24
Pb 10^{-6} Zn 10^{-6} Cd 10^{-6}	2oo	95,5	4,o	o,o4o	o,5	o,oo5	-	-	-	o,oo5	5o,oo± 1,41
a_1 $2,5x10^{-3}$	2oo	95,5	4,o	o,o4o	o,5	o,oo5	-	-	-	o,oo5	45,5o± 6,36
a_2 $2,5x10^{-3}$	2oo	91,5	7,5	o,o3o	1,o	o,o1o	-	-	-	o,o1o	62,oo± 5,66
Ko_1 -	2oo	95,5	4,o	o,o4o	o,5	o,oo5	-	-	-	o,oo5	44,oo± 5,66
Ko_2 -	2oo	94,o	5,5	o,o55	o,5	o,oo5	-	-	-	o,oo5	4o,oo± 2,83

Tabelle 9: Zusammengefaßte Ergebnisse[a] der Chromosomenanalyse nach unterschiedlichen Schwermetallapplikationen

(Versuche 1 - 8; Erläuterung der Zell- und Aberrationstypen in 2.4.; Na = Natriumacetat, Ko = Kontrollen)

Lymphozytenkultur	Zellzahl	N-Zellen %	U-Zellen %	gaps + isogaps /Zelle	S-Zellen %	chri/Zelle	Bruchrate
Cd 10^{-4} - 10^{-8} M (5 Ansätze mit 5 verschiedenen Konzentrationen)	1000	88,700	9,900	0,110[b,c]	1,400	0,011[b]	0,014[b]
Zn 10^{-3} - 10^{-7} M (5 Ansätze mit 5 verschiedenen Konzentrationen)	1000	94,100	5,400	0,056	0,500	0,004	0,005
Pb 10^{-3} - 10^{-7} M (7 Ansätze mit 4 verschiedenen Konzentrationen)	1400	94,140	5,290	0,054	0,570	0,004	0,006
Cd 10^{-4} - 10^{-6} M + Zn 10^{-4} - 10^{-7} M (5 Kombinationen)	1000	95,400	3,900	0,045	0,700	0,006	0,007

Cd 10^{-4} – 10^{-6} M + Pb 10^{-3} – 10^{-6} M (5 Kombinationen)	1000	94,900	4,000	0,042	1,100	0,008	0,012
Pb 10^{-4} – 10^{-6} M + Zn 10^{-3} – 10^{-7} M (6 Kombinationen)	1200	93,750	5,080	0,053	1,170	0,009	0,013
Pb 10^{-3} – 10^{-6} M + Zn 10^{-3} – 10^{-7} M + Cd 10^{-4} – 10^{-7} M (8 Kombinationen)	1600	94,875	4,000	0,042	1,125	0,007	0,014
Na $2,5 \times 10^{-3}$ – 10^{-4} M (8 Ansätze mit 4 verschiedenen Konzentrationen)	1600	94,375	5,125	0,054	0,500	0,004	0,006
Ko (9 Ansätze)	2000	94,150	5,400	0,057	0,450	0,004	0,005

a) Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus allen ausgewerteten Ansätzen der jeweiligen Versuche (Tab. 1 – 8). Ein statistischer Vergleich behandelter und nicht behandelter Kulturen erfolgte unter Verwendung der Einzelwerte aus den Versuchen mittels des U-Tests nach Mann und Whitney. Für diese Analyse wurden gaps + isogaps, Chromatidbrüche und die Bruchrate berücksichtigt.

b) signifikant erhöht gegen Leerkontrollen Ko ($P < 0,05$)

c) signifikant erhöht gegen Kombinationen Cd + Zn, Cd + Pb, Pb + Zn + Cd ($P < 0,05$)

4. Diskussion

4.1. Problematik der Konzentrationsangaben

Beim Ansetzen der Kulturen wurde bei Bleikonzentrationen $\geq 5 \times 10^{-4}$ M und/oder Zinkkonzentrationen $\geq 10^{-3}$ M Salzausfällung beobachtet. Obwohl die Löslichkeit von Acetaten dieser Metalle im Vergleich zu anderen Salzen sehr gut ist, war das Löslichkeitsprodukt - eventuell auch sich bildender anderer Salze, z.B. Pb-carbonat, Zn-sulfat u.a. - bei diesen hohen Konzentrationen doch überschritten. Ähnliche Beobachtungen wurden bisher bei in vitro-Versuchen mit Blei oder Zink nicht beschrieben. Möglicherweise beruht dies auf der Abfolge der beim Ansetzen einer Kultur notwendigen Pipettiervorgänge. Wird die Metallösung zuletzt der Kultur zugefügt, in der das Blut bereits suspendiert ist, so läßt sich eine Salzausfällung wegen der durch das Hämoglobin der Erythrozyten hervorgerufenen intensiven Rotfärbung der Suspension nicht mehr beobachten. Auch später kann die Salzausfällung übersehen werden, da sich die unlöslichen Salze ebenso wie die Blutzellen am Boden des Kulturgefäßes absetzen und einen gemeinsamen Bodensatz bilden.

Um nun präzisere Angaben über die tatsächlich in Lösung befindliche Metallmenge machen zu können, wurden nach Ende der dreistündigen Inkubationszeit die Metallkonzentrationen im Überstand gemessen (vgl. 2.2.3.). Zugrunde lag dabei die Hypothese, daß zweiwertige Metallionen, in diesem Fall Pb^{2+}, ungehindert durch semipermeable Zellmembranen diffundieren, ohne einen aktiven Transportmechanismus auszunützen, so daß intra- und extrazelluläre Konzentrationen nach einer gewissen Zeit identisch werden müßten.

Die Ergebnisse (Tab. 4) zeigen, daß diese Hypothese für niedrigere Bleikonzentrationen zutreffen könnte. Nicht nur bei der höchsten Bleikonzentration von 10^{-2} M, sondern auch bei 10^{-3} M jedoch dürfte zumindest ein Teil der tatsächlich gemessenen Metallmenge nicht gelöst, sondern lediglich als unlösliches Salz noch im Überstand suspendiert gewesen sein, obuchl theoretische und tatsächliche Konzentration unter Berücksichtigung aller Fehlerquellen hier bereits relativ gut übereinstimmen.
Aufgrund der vorliegenden Meßergebnisse jedenfalls zu vernachlässigen sind mögliche Adsorptions- und Freisetzungsvorgänge an und aus den Wänden der Reagenzgefäße, seien diese nun aus Quarz oder aus Glas, vorausgesetzt, Metallösungen oder Kulturen werden nicht zu lange in diesen Gefäßen aufbewahrt.
Ob ein vollständiger Ausgleich zwischen extra- und intrazellulärer, hier insbesondere intranukleärer, Konzentration nach einer bestimmten Zeit jedoch überhaupt erfolgt, ist zumindest für Cadmium und Zink sehr fraglich. Hildebrand und Cram (1979) zeigten, daß nach 72-stündiger Inkubationszeit Cadmium (als $^{109}CdCl_2$ zugesetzt) in Lymphozyten deutlich akkumuliert. Das intrazelluläre Cadmium war etwa 3000-fach höher konzentriert als im umgebenden Medium. Dabei waren nur 4 % im Kern, hingegen 96 % im Zytoplasma nachzuweisen. Cadmium war hier an ein dem Thionein sehr ähnliches Protein gebunden. Die Autoren weisen allerdings darauf hin, daß diese hohen Cd-Konzentrationen überschätzt sein könnten, da die Messungen wahrscheinlich auch das an der Zelloberfläche gebundene Cadmium enthalten.
Da Zink ebenfalls in der Lage ist, die Bildung von Metallothionein zu induzieren (Webb 1971), könnte es in ähnlicher Weise intrazellulär akkumulieren.

Aus diesen Gründen können über intrazellulär und insbesondere intranukleär vorkommende Metallkonzentrationen nur unzulängliche Angaben gemacht werden. Bisher können cytogenetische Ergebnisse nur unter der Voraussetzung verglichen und beurteilt werden, daß Metalle nicht notwendigerweise auch am Ort der Chromosomenschädigung, also im Zellkern, genauso hoch konzentriert sind wie anfänglich der Zellsuspension beigegeben. Begleitende Messungen unter Verwendung radioaktiver Nuklide könnten über die effektiven Metallkonzentrationen genauere Auskunft geben.

4.2. Expositionsbedingungen

Bei cytogenetischen in vivo-Untersuchungen sind die peripheren T-Lymphozyten des Blutes häufiges Testobjekt. Sie befinden sich im G_0-Stadium des Zellzyklus. Schwermetalle als Umweltnoxen wirken in vivo somit auf diese nicht proliferierenden Zellen ein. Da jedoch auch eine Exposition der sich kontinuierlich teilenden Stammzellen im Knochenmark und in den lymphatischen Geweben erfolgt, werden bei der Chromosomenanalyse der T-Lymphozyten des peripheren Blutes, die erst in der Kultur zur Zellteilung angeregt werden, nicht nur Effekte registriert, die in ruhenden Zellen induziert wurden.
In vitro müssen die kleinen Lymphozyten durch Zusatz von Phytohämagglutinin (PHA) transformiert werden, um dann einen oder mehrere Zellzyklen zu durchlaufen. Eine mitogene, PHA-ähnliche, Wirkung von Zink konnte von Schöpf u.a. (1969) und Biersch (1977) an Human- bzw. Schweinelymphozyten im Gegensatz zu Kirchner und Kühl (1978) nicht gefunden werden. Erfolgt nun die Metallexposition gleichzeitig mit der PHA-Stimulation, so wirken die Schwermetalle auf proliferierende Zellen ein; zumindest können nur diese analysiert werden.

Um nun in vitro den in vivo herrschenden Expositionsbedingungen möglichst nahe zu kommen, erfolgte bei den hier diskutierten Versuchen eine reine G_0-Exposition. Die Schwermetalle wurden den peripheren Lymphozyten angeboten, ohne daß eine gleichzeitige oder vorhergehende PHA-Stimulation erfolgte. Durch mehrfaches Auswaschen wurde versucht, die Metalle möglichst quantitativ aus der Suspension zu entfernen. Erst dann erfolgte die Stimulation durch PHA, durch die die T-Lymphozyten transformieren, in die G_1-Phase des Zellzyklus eintreten und schließlich Mitosen durchführen.
Ob und inwieweit diese Auswaschprozeduren tatsächlich eine deutliche Verringerung des Metallgehalts der Lymphozyten bewirkten, kann nicht geklärt werden. Bei den hohen Pb- und Zn-Konzentrationen blieb sicher ein Teil der unlöslichen Salze im Bodensatz, der dann bei erneuter Suspension in frischem Medium unter Umständen teilweise in Lösung gehen konnte.
Venugopal und Luckey (1975) beschreiben Komplexbildungen von Blei mit zellulären Phosphat- und Sulfhydrilgruppen. Ähnliche Komplexbildungen sind auch für Cadmium (Vallee und Ulmer 1972) und Zink (N.N. 1975) wie wohl für alle zweiwertigen Metalle bekannt. Zink und Cadmium induzieren sogar die Bildung eines Proteins, des Metallothioneins (Pulido u.a. 1966), an dessen Cysteinanteile sie gebunden werden.
Es ist demnach sehr wahrscheinlich, daß auch durch mehrmalige sorgfältige Auswaschvorgänge die Metalle nicht quantitativ aus den Kulturen entfernt werden konnten (vgl. auch 4.1.). Man kann also nicht von einer reinen G_0-Exposition sprechen, sondern muß davon ausgehen, daß die Metalle auch während anderer Zellzyklusphasen auf die Chromosomen einwirken konnten. Somit wäre auch zu erklären, daß die hier beschriebenen, durch Cadmium

verursachten Schäden (Tab. 2 und 9) in erster Linie chromatidale Aberrationen sind, die ja vorwiegend während der S- und der G_2-Phase des Zellzyklus entstehen.

Ferner ist zu berücksichtigen, daß in vivo kleine Dosen z.B. von Cadmium über einen langen Zeitraum aufgrund der Kumulationseffekte starke toxische Wirkungen auslösen, ohne daß akut stark erhöhte Blutspiegel zu messen sind (56). Diese Verhältnisse in vitro zu simulieren, ist aufgrund der Sequestration der Schwermetalle in bevorzugte Gewebe - Pb: Knochen, Cd und Zn: Leber und Nieren - und der sehr hohen Halbwertszeiten unmöglich. Der Nachweis, daß in vitro kurzzeitig einwirkende hohe Dosen eines Metalls gleiche cytogenetische Effekte haben wie langeinwirkende in vivo, fehlt bisher.
Eine Annäherung an in vivo herrschende Verhältnisse, die in den hier beschriebenen Versuchen angestrebt wurde, kann somit bei einer Schwermetallexposition nur in sehr beschränktem Maße gelingen.

4.3. Toxische Wirkungen

Schwermetalle hemmen zumindest in hohen Dosen die Zellproliferation. Röhr und Bauchinger (1976) zeigten dies für Cadmium an unstimulierten Fibroblasten des chinesischen Hamsters, Sorsa und Pfeifer (1973) berichteten über eine verlängerte Entwicklungszeit von Drosophila. Paton und Allison (1972) sahen ein merkliches Absinken der Mitoseindices bei menschlichen Fibroblasten und Lymphozyten bereits bei sehr niedrigen Cd-Konzentrationen. Eine Proliferationshemmung von Wurzelspitzenzellen von Vicia faba nach Zinkeinwirkung wurde von Marsch (1969) beschrieben. Deknudt und Deminatti (1979) konnten nach 48-stündiger Applikation von Pb-

acetat (10^{-2} M), $ZnCl_2$ (3×10^{-3} M) bzw. $CdCl_2$ (5×10^{-4} M) in menschlichen Lymphozytenkulturen keine Mitosen mehr beobachten. Diese Befunde stimmen bei Blei und Zink mit den eigenen Ergebnissen (vgl. 3.2.1. und 3.2.2.) auch hinsichtlich des Dosisbereichs gut überein, während eine proliferationshemmende Wirkung von Cadmium auch bei der höchsten Dosis von 10^{-4} M hier nicht gefunden werden konnte.
Eine mit steigenden Schwermetallkonzentrationen korrelierende Proliferationshemmung konnte, abgesehen von den höchsten Pb- und Zn-Konzentrationen, in den eigenen Versuchen nicht gefunden werden. Die starke Streuung der Mitoseindices (vgl. 3.2.2., Tab. 1 - 3) dürfte eher auf wechselnde Lymphozytenkonzentrationen im peripheren Blut - normal zwischen 1400 und 4500 / µl - oder unterschiedliche Reaktion der Lymphozyten auf die Stimulation durch PHA zurückzuführen sein.
Bei den eigenen Versuchen konnte bei Pb- und Zn-Konzentrationen $\geq 10^{-4}$ M eine Auffaserung der Chromosomenstruktur beobachtet werden, die die Anfärbbarkeit der Chromosomen und die optische Qualität der Präparate beeinträchtigte. Ähnliche Beobachtungen wurden von Obe und Sperling (1972) sowie Obersch (1977) beschrieben. Diese Effekte sind ebenso wie die Proliferationshemmung toxischen Einflüssen hoher Schwermetallkonzentrationen zuzuschreiben. Die negativen cytogenetischen Ergebnisse müssen unter der Prämisse betrachtet werden, daß möglicherweise nur besonders resistente Lymphozyten analysiert wurden.

4.4. Cytogenetische Effekte

4.4.1. Applikation einzelner Metalle

4.4.1.1. Cadmium

Die ältesten Ergebnisse über die cytogenetische Wirkung von Cadmium auf Chromosomen wurden an Pflanzenzellen gewonnen. Gläss (1956) beschrieb chromosomenschädigende Einflüsse bei Wurzelspitzenzellen von Vicia faba. W. Rosen (1957) fand "radiomimetische" Effekte an Pisum abyssinicum, für die er, wie auch für die erhöhte Mutationsrate, eine Störung der normalen Nucleinsäurensynthese durch das chelatbildende Cadmium als Ursache postulierte. Die im Vergleich etwa mit Röntgenstrahlen quantitativ geringere Schädigung wird der hohen Toxizität des Schwermetalls zugeschrieben. Aufgrund toxischer Effekte, die zur Pyknose oder zum Tod der Zelle führten, seien aufgetretene Chromosomenbrüche möglicherweise nicht mehr zu registrieren.
Neuere Arbeiten japanischer Wissenschaftler ergeben widersprüchliche Resultate. Shiraishi und Yosida (1972 b) sowie Shiraishi (1975) berichten von einer stark erhöhten Rate struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen in Lymphozyten von Patientinnen, die an "Itai-Itai" litten, einer chronischen Krankheit, deren Ätiologie vornehmlich auf einer hohen Cadmiumbelastung des Körpers beruhen soll. Sui u.a. (1975) finden dagegen bei Itai-Itai-Patientinnen keine gesteigerte Aberrationsrate, ebensowenig wie bei schwedischen Arbeitern einer Batteriefabrik. Sie berichten jedoch von einer erhöhten Inzidenz chromosomaler, nicht aber chromatidaler Aberrationen in Lymphozyten aller japanischen - Itai-Itai-Patientinnen und gesunde Kontrollpersonen zusammengenommen - im Vergleich zu den schwedischen Ver-

suchspersonen - Cd-exponierte und nicht exponierte zusammengenommen.

Shiraishi u.a. (1972 a) finden an menschlichen Lymphozyten auch in vitro ähnliche Ergebnisse wie bei ihren eigenen in vivo-Untersuchungen. Allerdings wurden nur 50 Metaphasen ausgewertet, die Kulturdauer betrug 72 Stunden, und gaps wurden nicht eigens aufgeführt, sodaß fraglich bleibt, ob sie nicht unter die strukturellen Störungen subsummiert wurden. Umeda und Nishimura (1979) beobachteten keine clastogenen Effekte in Mamma-Ca-Zellen der Maus.

Zasukhina u.a. (1977) fanden eine erhöhte Aberrationsrate in Rattenembryozellkulturen, wenn die Zellen durch ein Virus infiziert und gleichzeitig einer $CdCl_2$-Lösung exponiert wurden. Ursache ist ihrer Meinung nach ein synergistischer Effekt, vielleicht hervorgerufen durch eine Cadmium-bedingte verringerte Interferonsynthese, die eine ungehemmtere Virusvermehrung erlaubt.

Paton und Allison (1972) fanden in vitro weder in menschlichen Fibroblasten noch in Leukozyten, allerdings bei einer sehr niedrigen Cd-Konzentration von maximal 5×10^{-8} M, die in vivo dem Blutspiegel eines rauchenden Großstadtbewohners entspricht (56), eine clastogene Wirkung, sondern lediglich eine Abnahme der Mitoserate und stark kontrahierte Chromosomen. Ebenso negativ waren in vivo Befunde von O'Riordan u.a. (1970) in menschlichen Lymphozyten von Cadmium-Arbeitern sowie von Deknudt und Gerber (1979) in Mäuseknochenmarkzellen.

Röhr und Dauchinger (1976) fanden in Fibroblastenkulturen des chinesischen Hamsters eine signifikante Erhöhung von gaps und strukturellen Aberrationen. Ihre Befunde stimmen mit denen, die in dieser Arbeit vorgelegt werden, gut überein. Auch hier waren vorwiegend

offene Brüche vom chromatidalen Typ zu registrieren, bei den seltenen chromosomalen Aberrationen konnten Translokationsfiguren nicht beobachtet werden.
Eine befriedigende Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse kann vorläufig nicht gegeben werden. Unklar bleiben vor allem vier Punkte:
Liegen möglicherweise Unterschiede in der Resistenz der verschiedenen Zelltypen oder Testpopulationen gegen eine Cadmiumeinwirkung vor?
Wird eine mögliche clastogene Cd-Wirkung durch toxische Effekte verdeckt, die zum Zelltod oder subletalen Schäden führen und eine Registrierung von Aberrationen im Mikroskop verhindern?
Bewirkt eine langdauernde Exposition mit subtoxischen Cadmiumdosen durch fortgesetzte Störung intrazellulärer Stoffwechselvorgänge eine erhöhte Aberrationsrate, oder ist die Zelle dann in der Lage, entgiftende Abwehrmechanismen aufzubauen?
Beeinflussen andere versuchsbedingte Faktoren das Versuchsergebnis?
Zu den letzten beiden Fragen haben Deaven und Campbell (1976) eine interessante Arbeit veröffentlicht. Sie fanden in verschiedenen Zellsystemen eine deutliche Beeinflussung der clastogenen Cadmium-Wirkung durch die Art des beigefügten Serums und durch einen "Gewöhnungseffekt" an subtoxische Cadmiumspiegel. Am unempfindlichsten waren zum einen Zellen, denen u.a. fetales Kälberserum zugesetzt wurde, das aufgrund seines Reichtums an Disulfidresten in der Lage ist, Cadmium bereits extrazellulär zu binden, zum anderen solche, die aufgrund einer langen vorausgegangenen Cd-Exposition in niedriger Dosis Schutzmechanismen entwickelt hatten, vermutlich indem sie begannen, Metallothionein zu produzieren, das in der Lage ist, Cadmium im Cyto-

plasma zu binden.
Um zufriedenstellende Antworten auf die offenen Fragen geben und widersprüchliche Ergebnisse deuten zu können, sind meines Erachtens notwendig eine detaillierte Versuchsbeschreibung und möglichst eine Vereinheitlichung von Test- und Auswertebedingungen, begleitende Messungen der intrazellulären Metallkonzentrationen mit Hilfe radioaktiver Nuklide sowie Longitudinalstudien bei in vivo-Exposition.

4.4.1.2. Blei

Ähnlich wie für Cadmium sind auch die Ansichten über eine cytogenetische Wirkung von Blei geteilt. Schwanitz u.a. (1970) fanden in menschlichen Lymphozyten sowohl in vivo bei beruflicher Bleibelastung als auch in vitro eine deutlich erhöhte Aberrationsrate. Allerdings wurden achromatische Lücken nicht von tatsächlichen Bruchereignissen unterschieden. In einer späteren Arbeit von Schwanitz u.a. (1975) konnten die positiven in vitro-Ergebnisse nicht bestätigt werden. Kuro und Goyer (1969) fanden in Knochenmarkzellen von Mäusen, an die Bleiacetat verfüttert worden war, einen Anstieg von Chromatidbrüchen und acentrischen Fragmenten, allerdings bei einer sehr geringen Anzahl ausgewerteter Zellen. Ebenfalls erhöhte Aberrationsraten, vornehmlich vom chromatidalen Typ, fanden Nordenson u.a. (1978) bei Hüttenarbeitern mit erhöhten Blutbleispiegeln.
Negativ waren dagegen Untersuchungen von Dijkma und de France (1976), O'Riordan und Evans (1974), Sperling u.a. (1972), Bauchinger u.a. (1972 und 1977) sowie Schmid u.a. (1972) an Lymphozyten von Erwachsenen und Kindern mit erhöhter Bleiexposition.

Gegen eine clastogene Wirkung von Blei in vitro sprechen Befunde von Bauchinger und Schmid (1972) an Fibroblasten des chinesischen Hämsters, Obe und Sperling (1972), Schmid u.a. (1972) sowie Deknudt und Gerneratti (1978) an menschlichen Lymphozyten.
Für eine Zunahme der Rate von Zellen mit unspezifischen Defekten (gaps und isogaps), besonders bei hohen Bleikonzentrationen, sprechen dagegen neben den eigenen Befunden auch die Ergebnisse von Bauchinger und Schmid (1972), Deknudt u.a. (1977), Jacquet u.a. (1977), Kuro und Goyer (1969) sowie Nordenson u.a. (1978).
Deknudt u.a. (1977) sowie Deknudt und Gerber (1979) berichten über clastogene Effekte in Lymphozyten von Affen und Knochenmarkzellen von Mäusen, deren Nahrung Blei zugesetzt wurde, die aber extrem calciumarm war. Diese Kombination von chronischer Bleibelastung und Calcium-Verarmung des Körpers führte auf bisher ungeklärte Weise zu einer Erhöhung der Aberrationsrate, nicht jedoch eine der beiden Komponenten allein.
Ähnlich wie bei Cadmium kann eine Erklärung für die unterschiedlichen cytogenetischen Ergebnisse nicht gefunden werden. Ein eventueller Einfluß der Kulturbedingungen - Schwanitz u.a. (1975) fanden bei Verwendung von fetalem Kälberserum eine niedrigere Aberrationsrate als bei der Zugabe von Humanserum, was sich mit den Befunden von Deaven und Campbell (1980) bei Cd-Exposition deckt (vgl. 4.4.1.1.) - erscheint möglich, reicht als Erklärung aber nicht aus. Wesentlicher erscheint, daß einige Autoren auch in jüngeren Arbeiten entweder gaps fälschlicherweise als echte Aberrationen ansehen oder sie nicht extra erwähnen, sodaß unklar bleibt, ob sie nicht in die Rate der Chromatidbrüche miteinbezogen sind.

Aufgrund der überwiegenden Zahl negativer - auch der eigenen - Befunde sowie der Tatsache, daß ursprünglich positive Befunde in späteren Arbeiten derselben Autoren nicht in gleicher Weise bestätigt werden konnten, darf jedoch mit einiger Sicherheit angenommen werden, daß Blei weder in vivo noch in vitro eine clastogene Wirkung zukommt.

4.4.1.3. Zink

Erste cytogenetische Ergebnisse wurden an Pflanzen gewonnen. Glöss (1956) berichtet über eine deutlich erhöhte Aberrationsrate in Wurzelspitzenzellen von Vicia faba. V. Rosen (1957 und 1964) beschreibt den Auswirkungen von Röntgenstrahlen und schnellen Neutronen qualitativ ähnliche clastogene und mutagene Effekte, wenn Zink nicht in der für das Pflanzenwachstum optimalen Spuren-, sondern in hoher Dosis appliziert wird. Romeranzeva und Romeja (1970) konnten in Knochenmarkzellen von Mäusen, denen $ZnCl_2$ intraperitoneal injiziert worden war, keine clastogene Wirkung des Schwermetalls finden. Auch konnten sie eine Erhöhung der Rate dominant letaler Mutationen in Samenzellen der Maus nicht beobachten. Deknudt und Gerber (1979) fanden in Knochenmarkzellen von Mäusen, deren Futter einen hohen Zinkgehalt aufwies, Chromosomenschäden nur dann, wenn die Nahrung gleichzeitig streng calciumarm war. Positiv waren in vitro-Befunde von Deknudt und Dominatti (1978) in menschlichen Lymphozyten, wenn die Ergebnisse der Zink-Exposition mit denen der Leerkontrollen und Cd- sowie Pb-exponierter Lymphozyten, als Pool zusammengefaßt, verglichen wurden. Im Vergleich zu den Kontrollen allein waren die Resultate jedoch negativ. Oleresch (1977) fand keine erhöhten Aberrationsraten

in menschlichen Lymphozyten in vitro bei Expositionszeiten zwischen 24 und 144 Stunden.
Auch die eigenen negativen Befunde lassen es als wenig wahrscheinlich erscheinen, daß Zink, ein in Spuren essentielles Metall und Bestandteil lebenswichtiger Hormone und Enzyme (2o, 33), per se zumindest in menschlichen und tierischen Zellen zu einer Erhöhung der Rate struktureller Aberrationen führt. Gleichwohl bleibt die cytotoxische Wirkung von Zink in hohen Konzentrationen (vgl. 4.3.) ein nicht zu vernachlässigender Faktor.

4.4.2. Applikation von Metallkombinationen

Exposition gegenüber mehreren Metallen ist in vivo durchaus nicht selten. Untersuchungen zur cytogenetischen Wirkung mehrerer Schwermetalle in Kombination liegen jedoch nur in geringer Anzahl vor.
Léonard u.a. (1974) untersuchten Lymphozyten von Kühen, die eine Mehrmetallvergiftung überstanden hatten. In Bodenproben des Weidelandes wurden stark erhöhte Mengen mehrerer Metalle festgestellt, darunter auch Blei, Zink und Cadmium. Die cytogenetische Analyse ergab jedoch keine erhöhte Aberrationsrate. Deknudt u.a. (1973) fanden bei Arbeitern aus der Zinkindustrie, die in unterschiedlicher Weise und Dauer schwermetallexponiert waren, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine Vermehrung von Chromosomenaberrationen, wobei allerdings gaps als echte Aberrationen gezählt wurden. Als Ursache sahen sie die Bleibelastung der Arbeiter an, Zink und Cadmium waren ihrer Meinung nach nicht clastogen. Deknudt und Gerber (1979) untersuchten Knochenmarkzellen von Mäusen, deren Futter subletale Mengen an Blei, Zink und Cadmium enthielt. Sie fanden ebenso wie bei alleiniger Zugabe von Blei oder Zink (vgl. 4.4.1.2.

und 4.4.1.3.) eine erhöhte Aberrationsrate - gaps wiederum als strukturelle Aberrationen gewertet -, wenn die Nahrung gleichzeitig calciumarm war, nicht aber, wenn vollwertiges, calciumhaltiges Futter gegeben wurde. Da gleichzeitige Versuche bei alleiniger Zugabe von Cadmium cytogenetisch negative Resultate ergaben, sehen sie als Ursache für die clastogene Wirkung synergistische Effekte von Blei- und/oder Zink-Exposition und Calciummangel an. Bauchinger u.a. (1976) fanden in Lymphozyten von Arbeitern aus der Zinkindustrie, die außerdem blei- und cadmiumexponiert waren, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe eine dreifach erhöhte Rate struktureller Aberrationen sowie eineinhalbmal soviele unspezifische Defekte (gaps). Bei den Aberrationen überwogen offene Brüche, Strukturumbauten waren selten zu sehen. Aufgrund vorliegender Befunde wurden die cytogenetischen Effekte dem Cadmium allein oder einer synergistischen Wirkung mit Blei und Zink zugeschrieben.

In den eigenen Versuchen hatte die kombinierte Exposition von zwei oder allen drei untersuchten Metallen in verschiedenen Konzentrationen keine Erhöhung struktureller Aberrationen oder unspezifischer Effekte zur Folge, während dies bei alleiniger Cadmium-, nicht aber Zink- oder Bleibehandlung der Fall war. Die clastogene Wirkung von Cadmium muß demnach bei den Kombinationsversuchen durch Zink und/oder Blei verhindert worden sein.

Über synergistische und antagonistische Wirkungen der hier untersuchten Schwermetalle sind mehrere Arbeiten veröffentlicht.
Der u.a. (1976) untersuchten männliche Ratten, denen $CdCl_2$ und Pb-acetat in verschiedenen Konzentrationen einzeln und kombiniert intraperitoneal injiziert worden war. Während Cadmium allein eine katabole Stoffwechsel-

lage und andere toxische Effekte bewirkte, erkennbar an hypotropher Muskulatur, Fellveränderungen, mangelnder Gewichtszunahme, flacher Hyperventilation und Adynamie, war dies nach Pb- und Pb/Cd-Injektion nicht der Fall. Andererseits führten weder Blei noch Cadmium allein zu histologischen Veränderungen am Testis, kombinierte Pb/Cd-Applikation in niedrigeren Dosen dagegen hatte Veränderungen an den tubuli seminiferi und ein Sistieren der Spermatogenese zur Folge. Ferm (1969) untersuchte teratogene Wirkungen von Blei und Cadmium bei Hamsterembryos. Während intravenöse Cd-Applikation vordere Mißbildungen wie Exencephalie, Mikrophthalmie und Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten auslöste, bewirkte Blei vor allem Schwanzmißbildungen. Kombinierte Applikation der Metalle hatte einen Rückgang der vorderen, hingegen eine deutliche Zunahme der hinteren Mißbildungen zur Folge. Neben Nabelhernien und Schwanzmißbildungen trat häufig eine Gynpus-Bildung auf.

Gunn u.a. (1961) sahen nach subcutaner Cadmium-Injektion bei männlichen Ratten histologisch eine irreversible Zerstörung der tubuli seminiferi sowie passagere Schäden des interstitiellen Hodengewebes. Zinkzufuhr in zehnfach höherer Dosis konnte die morphologischen Effekte verhindern, die Ratten blieben fertil. Nach Ergebnissen von Mason und Young (1967) schützt Zink in mindestens 3o-fach höherer Dosierung vor Cadmiumschäden am Rattentestis, wenn es wenigstens einen Tag vorher appliziert wird. Simultane Gabe dagegen bietet nur bei subcutaner Injektion am selben Ort ausreichenden Schutz des Hodengewebes.

Venugopal und Luckey (1975) berichten über eine Hemmung Zn-abhängiger Enzyme durch Cadmium, etwa von ATPasen der Lunge mit der Folge eines toxischen Lungenödems oder eines Emphysems.

Quantitative Bestimmungen des Zinkgehalts im Lebergewebe weiblicher Mäuse nach subcutaner Cd-Injektion (Shimada u.a. 1976) ergaben zunächst ein Absinken der Zn-Konzentration. Binnen zwölf Stunden war der Ausgangswert wieder erreicht, nach 72 Stunden konnte eine Verdoppelung des Zinkgehalts gemessen werden. Die nach Cd-Exposition weiblicher Mäuse in Oozyten beobachteten numerischen Aberrationen sind nach Meinung der Autoren möglicherweise durch Interferenzen des Metalls mit zinkhaltigen Metalloenzymen bedingt, die beim Ablauf der Meiose eine wesentliche Rolle spielen.
Der Schutzeffekt von Zink gegen toxische Cadmiumeffekte auf Rattenhoden ist nach Ansicht von Webb (1971) dagegen vermutlich nicht auf gegenseitige Verdrängung aus Metalloenzymen zurückzuführen; der genaue Mechanismus sei noch unbekannt. Möglicherweise ist die Synthese von Metallothionein in Leber und Nieren, die durch hohe Dosen von Zink induziert wird, der entscheidende Entgiftungsschritt des Körpers. Jedenfalls akkumuliert parenteral zugeführtes Cadmium in der Leber - und wird dort durch Bindung an Thionein immobilisiert - viel schneller als sonst, wenn Zink ein bis zwei Tage zuvor zugeführt worden ist.
Direkte Folgerungen aus diesen Befunden auf die cytogenetischen Wirkungen der Exposition von Metallkombinationen können freilich nicht gezogen werden. Auf welche Weise Zink und/oder Blei die clastogene Wirkung von Cadmium, zumindest in den hier beschriebenen Versuchen an menschlichen Lymphozyten in vitro , aufheben, bleibt letztlich ungeklärt. Zu diskutieren wären zum einen kompetitive Verdrängungsmechanismen an intranukleären Enzymen oder an den Chromosomen selbst, die eine ausreichende Cd-Konzentration am Wirkort verhindern. Denkbar wäre aber auch, daß durch gleichzeitige Zn- und Pb-

Exposition die verstärkte Bildung von Metallothionein induziert wird, das ja nicht nur in Leber und Nieren (Pulido u.a. 1966), sondern auch von Lymphozyten (Hildebrand und Cram 1979) produziert werden kann. Durch die Bindung von Cadmiumionen an Disulfidreste dieses Proteins könnte eine so starke Verminderung der clastogen wirksamen Konzentration erreicht werden, daß strukturelle Aberrationen nicht in signifikant höherem Maße auftreten als in nicht metallexponierten Lymphozyten.

5. Cadmium als Umweltnoxe - experimentelle und klinische Beobachtungen

Toxische Wirkungen von Cadmium auf Organismen und Organsysteme sind wohlbekannt. Einige Forschungsergebnisse wurden bereits zitiert (vgl. 4.3., 4.4.1.1. und 4.4.2.). Experimentell belegt sind vor allem Cadmiumeffekte auf Fortpflanzungsorgane von Säugern. Gunn u.a. (1961), Haddow u.a. (1962), Mason und Young (1967) sowie Ramaja und Pomeranzeva (1977) untersuchten Hodengewebe von Mäusen und Ratten. Parenterale $CdCl_2$- bzw. $CdSO_4$-Applikation führte zur Nekrose der tubuli seminiferi und damit zum Verlust der Fertilität sowie zu vorübergehenden Schäden an den interstitiellen Leydig-Zellen, die wieder regenerierten. Shimada u.a. (1976) berichten über schwere diffuse Ovarhämorrhagien mit z.T. letalem Ausgang bei Mäusen nach subcutaner $CdCl_2$-Injektion.
Positiv sind Untersuchungen zur Carcinogenität von Cadmium an Ratten. Haddow u.a. (1962) konnten durch $CdSO_4$-Injektionen Sarkome am Applikationsort sowie Leydig-Zell-Tumoren auslösen; bei Mäusen blieben ihre Versuche jedoch negativ. Heath u.a. (1962) beobachteten nach intramuskulären Cd-Injektionen - Cadmium als Puder gelöst - zunächst Entzündungen sowie Kontrakturen. Sehr häufig entwickelten sich in der Folgezeit am Injektionsort Rhabdomyosarkome, teilweise mit fibrösen oder Spindelzellanteilen.
Akute Vergiftungen beim Menschen verlaufen häufig tödlich. Wird Cadmium etwa beim Schweißen Cd-beschichteter Metallteile als Rauch oder Staub in größeren Mengen inhaliert, kommt es nach unspezifischen Prodromi wie Übelkeit, Erbrechen und Schüttelfrost zu unproduktivem Reizhusten, Brustschmerzen und zunehmender Dyspnoe, später

zum Lungenödem und zur Pneumonie. Bei einer Obduktion (34) konnten neben Zeichen eines massiven Ödems auch arterielle Thromben in Lungengefäßen sowie Alveolarzellmetaplasien gefunden werden, an den Nieren Rindennekrose, Glomerulusinfarkte und Untergang der Tubulusepithelien.
Orale Vergiftungen werden wegen des heftigen Erbrechens und der dadurch geringeren Cadmiumaufnahme eher überstanden (Flick u.a. 1971), führen aber zumindest zu einer akuten hämorrhagischen Gastroenteritis (56).

Chronische Cadmiumintoxikation löst vielfältige Krankheiten aus. An der Lunge führt sie zu obstruktiven Atemwegserkrankungen und letztendlich zum Emphysem, möglicherweise durch Verminderung des alpha$_1$-Antitrypsin-Spiegels (Choudhury und Louria 1976). Die Tubulusdysfunktion der Niere äußert sich in einer Proteinurie - durch die Hemmung von Peptidasen (Venugopal und Luckey 1975) werden vor allem alpha$_2$- und beta-Globuline vermindert reabsorbiert -, Aminoacid- und Glucosurie sowie in einer zunehmend schlechteren Konzentrierungsfähigkeit. Die vermehrte Calcium- und Phosphatausscheidung hat einerseits häufig Nephrolithiasis, andererseits eine Entmineralisierung des Knochens zur Folge. Dies und die Störung des Vitamin-D-Stoffwechsels in der Niere manifestieren sich als Osteoporose und Osteomalazie; die in Japan gehäuft aufgetretene Itai-Itai-Krankheit wird zum größten Teil auf die Aufnahme überhöhter Cadmiummengen in Nahrung und Trinkwasser zurückgeführt (15, 56). Weitere mögliche Schäden chronischer Cadmiumbelastung sind hypochrome Anämie, möglicherweise auch renal bedingt, chronische Gastroenteritis und Pankreasinsuffizienz, gefolgt von einem Malabsorptionssyndrom.
Detaillierte Ausführungen über das Vorkommen von Cadmium in der Umwelt, seinen Metabolismus und toxische Effekte

auf Organismen finden sich in einer Veröffentlichung von Flick u.a. (1971), in den "WHO Environmental Health Criteria for Cadmium" (1977) sowie im Bericht "Luftqualitätskriterien für Cadmium" (1977) des Umweltbundesamtes Berlin.
Betrachtet man die vielfältigen toxischen Wirkungen von Cadmium, kann nicht genug vor einer Verharmlosung der Umweltbelastung durch dieses Schwermetall gewarnt werden. Es ist daher sehr zu begrüßen, daß die öffentliche Diskussion über dieses Thema nicht mehr verstummt.

6. Zusammenfassung

6.1. In sieben Versuchen wurden menschliche periphere Lymphozyten mit Cadmium-, Blei- und Zinkacetat sowie Kombinationen von jeweils zwei bzw. allen drei Schwermetallsalzen in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach dreistündiger G_0-Exposition wurden die Metalle ausgewaschen. In jeweils 200 Zellen pro Ansatz wurden nach 48-stündiger Kulturzeit Chromosomenanalysen durchgeführt.

6.2. Experimente mit Natriumacetat- und Leerkontrollen erfolgten unter identischen Versuchsbedingungen.

6.3. Vermehrtes Auftreten struktureller Aberrationen konnte nur nach alleiniger Cadmium-Behandlung gefunden werden. In geschädigten Zellen wurden fast ausschließlich offene Brüche beobachtet.

6.4. Eine erhöhte Rate unspezifischer Defekte fand sich ebenfalls nur nach alleiniger Cadmium-Exposition. Hier konnte eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewiesen werden.

6.5. Die clastogene Wirkung von Cadmium in vitro wird durch gleichzeitige Blei- und Zink-Applikation verhindert. Verantwortlich dafür sind wahrscheinlich entweder kompetitive Verdrängungseffekte oder die Induktion der Bildung von Metalloproteinen.

6.6. Experimentelle und klinische Beobachtungen weisen auf die hohe Toxizität von Cadmium hin.

Literaturverzeichnis

1. Bauchinger, M., Dresp, J., Schmid, E., Englert, N., Krause, Ch.
Chromosome Analyses of Children after Ecological Lead Exposure
Mutat. Res. 56 (1977) 75 - 79

2. Bauchinger, M., Schmid, E., Einbrodt, H.J., Dresp, J.
Chromosome Aberrations in Lymphocytes after Occupational Exposure to Lead and Cadmium
Mutat. Res. 40 (1976) 57 - 62

3. Bauchinger, M., Schmid, E.
Chromosomenanalysen in Zellkulturen des Chinesischen Hamsters nach Applikation von Bleiacetat
Mutat. Res. 14 (1972) 95 - 100

4. Bauchinger, M., Schmid, E., Schmidt, D.
Chromosomenanalyse bei Verkehrspolizisten mit erhöhter Bleilast
Mutat. Res. 15 (1972) 407 - 412

5. Bijlema, J., de France, M.
Cytogenetic Investigations in Volunteers Ingesting Inorganic Lead
Int. Arch. Occup. Environ. Health 38 (1976) 145 - 148

6. Blersch, B.
Die biologische und medizinisch-klinische Bedeutung von Zink unter besonderer Berücksichtigung seiner mitogenen und cytogenetischen Wirkung
Diplomarbeit (1977), Ludwig-Maximilians-Universität München, Fakultät für Biologie

7. Bui, T., Lindsten, J., Nordberg, G.
Chromosome Analysis of Lymphocytes from Cadmium Workers and Itai-Itai-Patients
Environ. Res. 9 (1975) 187 - 195

9. Choudhury, R., Louria, D.
Influence of Cadmium and Other Trace Metals on Human alpha$_1$-Antitrypsine: An in vitro Study
Science 191 (1976) 469 - 471

8. Drayton, L.L., Campbell, E.J.
Factors Affecting the Induction of Chromosomal Aberrations by Cadmium in Chinese Hamster Cells
Cytogenet. Cell Genet. 26 (1980) 251 - 260

10. Deknudt, Gh., Colle, A., Gerber, G.B.
Chromosomal Abnormalities in Lymphocytes from Monkeys Poisoned with Lead
Mutat. Res. 45 (1977) 77 - 83

11. Deknudt, Gh., Deminatti, M.
Chromosome Studies in Human Lymphocytes after in-vitro-Exposure to Metal Salts
Toxicology 10 (1978) 67 - 75

12. Deknudt, Gh., Gerber, G.B.
Chromosomal Aberrations in Bone-Marrow Cells of Mice Given a Normal or a Calcium-Deficient Diet Supplemented with Various Heavy Metals
Mutat. Res. 62 (1979) 165 - 169

13. Deknudt, Gh., Léonard, A., Ivanov, B.
Chromosome Aberrations Observed in Male Workers Occupationally Exposed to Lead
Environ. Physiol. Biochem. 7 (1977) 132 - 136

14. Das, B., El Nim, E., Yousef, M., Fahim, M.
Environmental Interaction of Lead and Cadmium on Reproduction and Metabolism of Male Rats
Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm. 14 (1976) 699 - 713

15. Ferm, V.H.
The Lymphoteratogenic Effect of Lead and Cadmium
Experientia 25 (1969) 56 - 57

16. Flick, D., Kraybill, H., Dimitroff, J.
Toxic Effects of Cadmium: A Review
Environ. Res. 4 (1971) 71 - 85

17. Glüsz, E.
Untersuchungen über die Einwirkung von Schwermetallsalzen auf die Wurzelspitzenmitose von Vicia faba.
II.Teil
Zeitschr. Bot. 44 (1956) 1 - 50

18. Gunn, S.A., Gould, T.C., Anderson, W.A.
Zinc Protection Against Cadmium Injury to Rat Testis
Arch. Pathol. 71 (1961) 274 - 281

19. Haddow, A., Dukes, C.E., Roe, F.J.C., Mitchley, B.C.V., Pugh, R.C.B., Cameron, K.M.
The Carcinogenicity of Cadmium Sulphate
Ann. Rep. Brit. Emp. Cancer Camp. 40 (1962) 34 - 35

20. Hambidge, K., Meldner, K., Walravens, P.
Zinc, Acrodermatitis Enteropathica, and Congenital Malformations
Lancet (1975) 577 - 578

21. Heath, J.C., Daniel, M.R., Dingle, J.T., Webb, M.
Cadmium as a Carcinogen
Nature 193 (1962) 592 - 593

22. Herich, R.
Effect of Zinc on Mitosis
Naturwissenschaften 56 (1969) 286 - 287

23. Hildebrand, C.E., Cram, L.S.
Distribution of Cadmium in Human Blood Cultured in Low Levels of $CdCl_2$: Accumulation of Cd in Lymphocytes and Preferential Binding to Metallothionein
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161 (1979) 433 - 443

24. Decruet, R., Léonard, A., Gerber, G.B.
Cytogenetic Investigations on Mice Treated with Lead
J. Toxicol. Environ. Health 2 (1977) 619 - 624

25. Malinina, L.M., Polukhina, G.M.
Mutagenic Effect of Heavy Metal Salts on Salmonella in Activation Systems in vivo and in vitro
Mutat. Res. 46 (1977) 223 - 224

26. Kennedy, G.L., Arnold, D.W.
Absence of Mutagenic Effects after Treatment of Mice with Lead Compounds
EMS Newsletter 5 (1971) 37

27. Kirchner, H., Rühl, H.
Stimulation of Human Peripheral Lymphocytes by Zinc in vitro
Exp. Cell Res. 61 (1970) 229 - 230

28. Kogan, J.S., Grozdova, T.Y., Kholikova, T.A.
Investigation of the Mutagenic Effect of $CdCl_2$ on Drosophila Melanogaster Germ Cells
Genetika 13 (1977) 2136 - 2140

29. Léonard, A., Deknudt, Gh., Debackere, M.
Cytogenetic Investigations on Leucocytes of Cattle Intoxicated with Heavy Metals
Toxicology 2 (1974) 269 - 273

30. Mason, K.E., Young, J.C.
Effectiveness of Selenium and Zinc in Protecting Against Cadmium-Induced Injury of the Rat Testis
1st International Symposium on Selenium in Biomedicine. Westport (1967) 383 - 394

31. Muro, L., Boyer, R.
Chromosome Damage in Experimental Lead Poisoning
Arch. Pathol. 87 (1969) 660 - 663

32. Nordenson, I., Beckman, G., Beckman, L., Nordström, S.
Occupational and Environmental Risks in and around a Smelter in Northern Sweden. IV. Chromosomal Aberrations in Workers Exposed to Lead
Hereditas 83 (1978) 263 - 267

33. N.N.
Bedeutung von Zink für den Organismus
Cit. in: Naturwiss. Rundschau 28 (1975) 124

34. N.N.
Cadmium Poisoning
Leading Article. Brit. Med. J. 2 (1967) 392 - 393

35. Obe, G., Sperling, K.
Zur Wirkung von Bleiacetat auf menschliche Lymphozytenchromosomen in vitro
Blei und Umwelt (hrsg. v. Deutschen Gesundheitsamt, Berlin), (1972) 90 - 95

36. O'Riordan, M.L., Evans, H.J.
Absence of Significant Chromosome Damage in Males Occupationally Exposed to Lead
Nature 247 (1974) 50 - 53

37. O'Riordan, M.L., Hughes, E.G., Evans, H.J.
Chromosome Studies on Blood Lymphocytes of Men Occupationally Exposed to Cadmium
Mutat. Res. 58 (1978) 305 - 311

38. Paton, G.R., Allison, A.C.
Chromosome Damage in Human Cell Cultures Induced by Metal Salts
Mutat. Res. 16 (1972) 332 - 336

39. Pomerantzeva, M.D., Rameja, L.K.
Lack of Mutagenic Effect of Cd and Zn Salts in Somatic and Germ Mouse Cells
Genetika 14 (1978) 2212 - 2214

40. Pulido, P., Kägi, J., Vallee, B.
Isolation and Some Properties of Human Metallothionein
Biochemistry 5 (1966) 1768 - 1777

41. Romaja, L.K., Pomerantzeva, M.D.
Investigation of Cadmium Chloride Mutagenic Effect on Germ Cells of Male Mice
Genetika 13 (1977) 59 - 63

42. Röhr, G., Bauchinger, M.
Chromosome Analyses in Cell Cultures of the Chinese Hamster after Application of Cadmium Sulphate
Mutat. Res. 40 (1976) 125 - 130

43. v. Rosen, G.
Mutations Induced by the Action of Metal Ions in Pisum
Hereditas 43 (1957) 644 - 664

44. v. Rosen, G.
Mutations Induced by the Action of Metal Ions in Pisum II. Further Investigations of the Mutagenic Action of Metal Ions and Comparison with the Activity of Ionizing Radiation
Hereditas 51 (1964) 89 - 134

45. Schmid, E., Bauchinger, M., Pietruck, S., Hall, G.
Die cytogenetische Wirkung von Blei in menschlichen peripheren Lymphozyten in vitro und in vivo
Mutat. Res. 16 (1972) 401 - 406

46. Schöpf, E., Schulz, K.H., Isensee, I.
Untersuchungen über den Lymphozytentransformationstest bei Quecksilberallergie
Arch. klin. exp. Derm. 234 (1969) 420 - 433

47. Schuenitz, G., Gebhart, E., Rott, H.-D., Schaller, K.-H., Essing, H.-G., Lauer, G., Prestele, H.
Chromosomenuntersuchungen bei Personen mit beruflicher Bleiexposition
Dtsch. Med. Wschr. 18 (1975) 1007 - 1011

48. Schuenitz, G., Lehnert, G., Gebhert, E.
Chromosomenschäden bei beruflicher Bleibelastung
Dtsch. Med. Wschr. 95 (1970) 1636 - 1641

49. Shimada, T., Watanabe, T., Endo, A.
Potential Mutagenicity of Cadmium in Mammalian Cocytes
Mutat. Res. 40 (1976) 389 - 396

50. Shiraishi, Y.
Cytogenetic Studies in 12 Patients with Itai-Itai Disease
Humangenetik 27 (1975) 31 - 44

51. Shiraishi, Y., Kurahashi, H., Yosida, T.H.
Chromosomal Aberrations in Cultured Human Leucocytes Induced by Cadmium Sulfide
Proc. Japan Acad. 48 (1972) 133 - 137

52. Shiraishi, Y., Yosida, T.
Chromosomal Abnormalities in Cultured Leucocyte Cells from Itai-Itai Disease Patients
Proc. Japan Acad. 48 (1972) 248 - 251

53. Sorsa, M., Pfeifer, S.
Effects of Cadmium on Development Time and Prepupal Puffing Pattern of Drosophila Melanogaster
Hereditas 75 (1973) 275 - 277

54. Sperling, K., Weiß, G., Münzer, M., Obe, G.
Chromosomenuntersuchung an bleiexponierten Arbeitern
Blei und Umwelt (hrsg. v. Deutschen Gesundheitsamt, Berlin), (1972) 87 - 89

55. Suter, K.E.
Studies of the Dominant-lethal and Fertility Effects of the Heavy Metal Compounds Methylmercuric Hydroxide, Mercuric Chloride, and Cadmium Chloride in Male and Female Mice
Mutat. Res. 30 (1975) 365 - 374

56. Umweltbundesamt (Hrsg.)
Luftqualitätskriterien für Cadmium
Berichte 4 / 1977

57. Maeda, M., Nishimura, T.
Inducibility of Chromosomal Aberrations by Metal Compounds in Cultured Mammalian Cells
Mutat. Res. 67 (1979) 221 - 229

58. Vallee, B.L., Ulmer, D.D.
Biochemical Effects of Mercury, Cadmium and Lead
Ann. Rev. Biochem. 41 (1972) 91 - 128

59. Venugopal, B., Luckey, T.D.
Toxicology of Non-Radioactive Heavy Metals and Their Salts. In: Environmental Quality and Safety. Suppl. Vol. I: Heavy Metal Toxicity, Safety, and Hormology
Georg Thieme Publishers, Stuttgart (1975)

60. Watanabe, T., Shimada, T., Endo, A.
Mutagenic Effects of Cadmium on Mammalian Oocyte Chromosomes
Mutat. Res. 67 (1979) 349 - 356

61. Webb, M.
Protection by Zinc Ions Against the Toxicity of Cadmium Ions
Biochem. J. 124 (1971) 17 - 18

62. Weber, E.
Grundriß der Biologischen Statistik
Stuttgart (1967)

63. WHO Environmental Health Criteria for Cadmium (Summary)
Cit. in: Ambio 6 (1977) 287 - 290

64. Zenzen'khina, G.P., Sinelschikova, T.A., Lvova, G.N., Filkova, E.G.
Molecular-Genetic Effects of Cadmium Chloride
Mutat. Res. 45 (1977) 169 - 174

Lebenslauf

9. November 1952	geboren in Ingolstadt Eltern: Stanislaus Gasiorek, Studiendirektor i.R. Leopoldine Gasiorek, geb. Porth, Hausfrau
1958 - 1962	Volksschule St.Josef in Ingolstadt
1962 - 1971	Reuchlin-Gymnasium in Ingolstadt
Juni 1971	Abitur
1971 - 1978	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
19. Oktober 1978	Abschluß der Ärztlichen Prüfung
2. November 1978	Erteilung der Approbation als Arzt
Februar 1979 - April 198o	Ableistung des Grundwehrdienstes als Stabsarzt in München und Regensburg
seit 1. Mai 198o	Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus 843o Neumarkt/Opf., Innere Abteilung

Sengenthal, im Dezember 198o

Karl Schmidt

Mein herzlicher Dank gilt

Herrn Prof. Dr. M. Bauchinger für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Laborplatzes und ganz besonders für die intensive Betreuung,

Herrn Dr. P. Schramel für die Durchführung der atomabsorptionsspektrometrischen Messungen,

Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Schmid für mancherlei hilfreiche Hinweise

und nicht zuletzt Frau R. Giesen für ihre geduldigen Anleitungen bei der Arbeit im Labor.